

飼育，投与，観察，測定，採血	池田元太
血漿分離	高野 泰
統計学的処理	正木文夫
被験物質管理	小宮山芳幸

9. 試験の基準

遵守した基準：

- ・非臨床薬物動態試験ガイドライン（医薬審 496 号）
- ・「申請資料の信頼性基準」（薬事法施行規則第 43 条）

なお，当試験施設の信頼性保証部門が最終報告書に記載されたデータと生データとの整合性について確認し，最終報告書に「最終報告書の確認書」を添付した。

10. 動物実験倫理

本試験は IACUC（Institutional Animal Care and Use Committee，動物実験審査委員会）によって承認を受けた（承認番号：2013-177）。なお，当試験施設は AAALAC（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International，国際実験動物管理公認協会）の認証を取得した施設である（認証番号：001182）。

11. 使用したコンピュータシステム

本試験では安全性試験システム LATOX -F/V6（株式会社富士通アドバンストエンジニアリング，以下 LATOX）を用いた。

12. 試験関係資料の保存

保存場所：当試験施設 資料保存施設

保存資料：試験計画書（原本）及び試験計画書変更書（原本），被験物質に関する記録，試験系に関する記録，生データ，最終報告書（原本），その他記録文書

保存期間：試験終了後 10 年間保存

13. 要約

雄性ラットに SR-0379 を 1, 10, 100 mg/2 mL/kg の用量で単回皮下 (s.c.), または 0.5 mg/1 mL/kg の用量で単回静脈内 (i.v.) 投与し, 経時的に SR-0379 の血漿中濃度を測定し, 血漿中濃度推移について検討した.

皮下投与群において SR-0379 の最高血漿中濃度 (C_{max}) は投与量増加に伴い, 高値を示したが, 投与量に比例していなかった. 皮下投与群での最高血漿中濃度到達時間 (t_{max}) は 1, 10, 及び 100 mg/kg でそれぞれ 3.0, 2.8 及び 2.8 min と算出され, ほぼ一定であった. 消失半減期 ($t_{1/2\beta}$) は静脈内投与で 15 min, 皮下投与で 1, 10 及び 100 mg/kg でそれぞれ NC (算出不能), 3.7 及び 8.8 min であった. 血漿中濃度-時間曲線下面積である AUC_t 及び AUC_{inf} は投与量増加に伴い, 高値を示したが, AUC_t の値は 1 mg/kg (s.c.) と 10 mg/kg (s.c.) の間で約 52 倍, 10 mg/kg (s.c.) と 100 mg/kg (s.c.) の間で約 4 倍であり, 投与量と AUC_t の間に線形性は認められなかった.

皮下投与したときの SR-0379 の生物学的利用率は 1, 10 及び 100 mg/kg でそれぞれ NC, 2.9 及び 1.2% であった.

静脈内投与での分布容積は 22300 mL/hr/kg, 全身クリアランスは 3090 mL/kg であった.

14. 試験材料及び方法

14.1. 被験物質及び投与検体

14.1.1. 被験物質

名称：SR-0379

ロット番号：Y01011C1

供給元及び受領日：国立大学法人大阪大学，2013年12月25日

使用量：0.44 g

分子量：2665.5

純度：Peptide Purity；98.47%（Certificate of analysis，2013年3月1日）

ペプチド含量；82.5%（合成時のCertificate of analysis，GLP非適用，2010年3月25日）

性状：White lyophilized powder

保存条件：-20°C

保存場所：研究本館 検体調製室 メディカルフリーザー（設定温度：-30°C，許容範囲：-40~-20°C，保存期間：2013年12月25日~2014年1月7日，実測値：-34~-30°C）

残余被験物質の処理：実験終了後，被験物質管理責任者に移管した。

14.1.2. 投与検体

14.1.2.1. 媒体

名称：日本薬局方生理食塩液（以下，生理食塩液）

製造元：扶桑薬品工業株式会社

14.1.2.2. 投与検体の調製方法

被験物質を研究本館 検体調製室 メディカルフリーザーから搬出し，相対湿度30%以下の条件（デシケータ内）で2時間以上調湿した。電子天秤を用いて被験物質の必要量を秤量し（ペプチド含量にて補正，補正係数1.21），生理食塩液に溶解して規定量にメスアップし，規定濃度の投与液を調製した。投与液調製時にPP製の容器を使用し投与液の保存にはPP製容器を用いた。なお，調製は用時に実施した。

14.1.2.3. 残余投与検体の処理

感染性廃棄物として処分した。

14.2. 使用動物及び飼育環境

14.2.1. 使用動物

種：ラット

系統：CrI:CD (SD)，SPF

種及び系統の選択理由：本系統のラットは毒性試験に多用されており，かつ当該試験施設における背景データが豊富である。

供給源：日本チャールス・リバー株式会社

週齢・性別・数：6週齢，雄18匹（受入時）

7週齢，雄 16 匹（投与時）

体重範囲：188～211 g（受入時）

286～337 g（投与時）

受入時検査：体重測定，一般状態観察し異常の見られない動物を受入れた。

検査期間中検査：一般状態を 1 日 1 回観察した。

検査終了日：体重測定，一般状態を観察し健康状態を判定した。

馴化期間中検査：一般状態の観察を毎日 1 回，馴化最終日に，体重測定を行った
（Appendix 1-1, 1-2）。

14.2.2. 飼育環境

動物室：バリアシステム飼育室（第 1 動物実験棟，A-5 室）

ケージ：自動洗浄式ラックに取り付けた金網床式金網製ケージ（W15×D30×H17 cm）
で個別飼育した。

温度：22°C（許容範囲：19～25°C）

（実測値：20.3～23.2°C，期間：2013 年 12 月 25 日～2014 年 1 月 7 日）

相対湿度：50%（許容範囲：30～70%）

（実測値：41.1～55.8%，期間：2013 年 12 月 25 日～2014 年 1 月 7 日）

換気回数：10～15 回／時

照明時間：7～19 時

飼料：オートクレーブ滅菌した固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を
自由摂取させた。

飲料水：公共水道水を紫外線照射し給水ノズルにより自由摂取させた。

汚染物質の分析：以下のデータについて，当試験施設で定めた飼料中の汚染物質の許
容基準値及び水質基準に適合していることを確認した。

飼料：飼料供給者から入手した全使用ロット（Lot No. 131008）の分析結果

飲料水：6 か月ごとに採取した飲料水について，株式会社山梨県環境科学検査
センターで測定した分析結果

14.2.3. 個体識別方法

個体識別：受入日に背側尾根部における尾の中央部より先端側に油性インクで記入し
た個体番号をつけて識別した。群分け後には尾根部に動物番号を油性インクで記入
した。

14.3. 群分け

実施時期：馴化最終日（群分け日）

選抜：馴化中に異常がないことを確認した動物を用いて，群分け日の体重を基に，平
均体重より最も離れている個体から除外し必要動物数（雄 16 匹）を選抜し
た。

群分け：平均体重が揃うように層別割付した。各群内の並び順は動物番号の若い順と
した。（LATOX 使用）群分け後，試験に組み入れなかった動物は本試験か
ら除外し株式会社シミックバイオリサーチセンターの社内保有動物として管

理した。その後、試験計画書の変更により、試験動物として使用した。

14.4. 群構成及び投与量

以下のとおり 4 群とした。

投与群	投与量 (mg/kg)	投与液 濃度 (mg/mL)	投与液量 (mL/kg)	動物数 (動物番号)
1 SR-0379 (静脈内)	0.5	0.5	1	4 (01M03~01M06)
2 SR-0379 (皮下) 低用量	1	0.5	2	4 (02M01~02M04)
3 SR-0379 (皮下) 中用量	10	5	2	4 (03M01~03M04)
4 SR-0379 (皮下) 高用量	100	50	2	4 (04M01~04M04)

14.5. 投与量の設定理由

進行中のラット反復皮下投与毒性試験において、投与初日及び投与 28 日後の TK 測定で 1000 µg/kg 投与群まで SR-0379 の血漿中濃度は定量下限値 (5 ng/mL) 未満であった¹⁾。そこで本試験では、SR-0379 を皮下投与することで全身循環血液中心にて SR-0379 が定量できるかどうかを確認するため、100 倍まで投与量を上げて血漿中濃度推移を検討した。

14.6. 投与

投与経路：皮下投与

投与経路の選択理由：臨床適用経路は、創傷部位に経皮投与することを計画している。

投与方法：ディスポーザブルシリンジ及び注射針を用いて背部皮下に投与した。

投与方法の選択理由：ラットの皮下投与として一般的な方法である。

投与回数：単回投与

投与液量：2 mL/kg とし投与日の体重から算出した。

投与経路：静脈内投与

投与経路の選択理由：生物学的利用率の (BA; bioavailability) 算出のため。

投与方法：ディスポーザブルシリンジ及び注射針を用いて尾静脈内に投与した。

投与方法の選択理由：ラットの静脈内投与として一般的な方法である。

投与回数：単回投与

投与液量：1 mL/kg とし投与日の体重から算出した。

14.7. 観察、測定及び検査

基準日：投与開始日 投与第1日

14.7.1. 一般状態

対象動物：全例

頻度：各採血時点で、生死及び一般状態を観察した。

14.7.2. 死亡及び瀕死動物の取り扱い

死亡及び瀕死動物はみられなかった。

14.7.3. 体重

実施時期：投与開始日に測定した。

14.7.4. 採血

採血日：投与開始日（投与第1日）

採血時点：投与前、投与終了後2, 5, 15, 30分, 1及び2時間の計7時点

採血方法：予め、EDTA-2K（同仁化学研究所株式会社）を入れたディスポーザブルシリリング及び針を用いて、無麻酔下で頸静脈から各時点、血液約0.5 mLを採取し、血漿に分離するまで氷冷下保存した。

血漿分離：3000 rpm, 4°C, 15分間遠心分離し、得られた血漿をポリプロピレン製サンプルチューブに分注後、分注量の3倍量の4%リン酸（超純水とリン酸を240:10 (v/v)の割合で混合して調製）を加えた。サンプルは氷冷下にて取扱い、研究本館分析室（2）の超低温フリーザー（設定温度：-80°C, 許容範囲：-90~-70°C, 実測値：-81.1~-75.5°C, 保存期間：2014年1月6日~2014年1月9日）で凍結保存した。

14.7.5. 試料の送付

採取した血漿は、ドライアイスと共に梱包し、凍結状態（冷凍便）で積水メディカル株式会社 薬物動態研究所に送付した。

送付先：積水メディカル株式会社 薬物動態研究所

〒319-1182 茨城県那珂郡東海村村松 2117

TEL 029-282-0232 FAX 029-282-1681

試験責任者：佐野 友一

14.7.6. 動物処理

採血終了後、炭酸ガスの吸入により動物は安楽死処分した。

14.7.7. 結果の取り扱い

SR-0379の血漿中濃度の測定値及びパラメータ解析結果を入手し、最終報告書に反映させた。

14.7.8. 統計学的処理

定量データについて、以下を実施

平均値と標準偏差：Microsoft® EXCEL 2003 Windows 版（Version 11）を用いて算出した。

15. 試験結果

15.1. 一般状態

一般状態の観察結果を Table 1 に示した。

いずれの投与群においても瀕死及び死亡例はみられなかった。

<被験物質と関係した変化>

0.5mg/kg（静脈内投与）で投与後 5 分～1 時間にかけて自発運動の抑制がみられた。

15.2. 体重

投与日の体重を Table 2 に示した。

15.3. 血漿中濃度測定

SR-0379 の血漿中濃度測定の結果を添付資料 1 の Table 1～4, Figure 1～6 及び Appendix 1, 2 に示した。PK パラメータの概要は表 1, 2 にまとめた。

SR-0379 の最高血漿中濃度 (C_{max}) は 1 mg/kg (s.c.) 投与群, 10 mg/kg (s.c.) 投与群, 100 mg/kg (s.c.) 投与群において、投与量増加に伴い、高値を示したが、投与量に比例していなかった。0.5 mg/kg (i.v.) 投与群における 0 時間の濃度 (C_0) は 164 ng/mL であった。皮下投与での最高血漿中濃度到達時間 (t_{max}) は 1, 10 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 3.0, 2.8 及び 2.8 min と算出され、ほぼ一定であった。消失半減期 ($t_{1/2}$) は 0.5 mg/kg (i.v.) 投与群では 15 min, 皮下投与では 1, 10 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ NC (算出不能), 3.7 及び 8.8 min であった。

0 時間から時間 (t) までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_t) 及び 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{inf}) は投与量増加に伴い、高値を示した (AUC_{inf} において 1 mg/kg 投与群は NC であった)。1 mg/kg (s.c.) 投与群, 10 mg/kg (s.c.) 投与群, 100 mg/kg (s.c.) 投与群の AUC_t の値は 1 mg/kg (s.c.) 投与群 と 10 mg/kg (s.c.) 投与群 の間で約 52 倍, 10 mg/kg (s.c.) 投与群 と 100 mg/kg (s.c.) 投与群 の間で約 4 倍であり、投与量と AUC_t の間に線形性は認められなかった。皮下投与したときの SR-0379 の生物学的利用率 (F) は 1, 10 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ NC, 2.9 及び 1.2% であった。

0.5 mg/kg (i.v.) 投与群における SR-0379 の全身クリアランス (CL_{total}) は 22300 mL/hr/kg, 定常状態における分布容積 (Vd) は 3090 mL/kg であった。

表1 PKパラメータの概要

投与量 (投与経路)	C ₀ (ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (min)	t _{1/2} (min)	AUC _t (ng・h/mL)	AUC _{inf} (ng・h/mL)	F(%)
0.5 mg/kg (i.v.)	164	—	2.0	15	19.8	22.5	-
1 mg/kg(s.c.)	—	5.10	3.0	NC	0.244	NC	NC
10 mg/kg (s.c.)	—	121	2.8	3.7	12.9	12.6	2.9
100 mg/kg(s.c.)	—	297	2.8	8.8	51.2	52.7	1.2

表2 PKパラメータの概要

投与量 (投与経路)	CL _{total} (mL/hr/kg)	Vd (mL/kg)
0.5 mg/kg (i.v.)	22300	3090

16. 考察及び結論

雄性ラットに SR-0379 を 1, 10 及び 100 mg/2 mL/kg の用量で単回皮下, または 0.5 mg/1 mL/kg の用量で単回静脈内投与し, 経時的に SR-0379 の血漿中濃度を測定し, 被験物質の血漿中濃度推移について検討した.

皮下投与群において SR-0379 の最高血漿中濃度 (C_{max}) は投与量増加に伴い, 高値を示したが, 投与量に比例していなかった. 皮下投与での t_{max} は 1, 10 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 3.0, 2.8 及び 2.8 min であった. t_{1/2} は 0.5 mg/kg (i.v.) 投与群で 15 min, 皮下投与では 1, 10 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ NC, 3.7 及び 8.8 min であった. AUC_t 及び AUC_{inf} は投与量に伴い, 高値を示したが, 投与量と AUC_t の間に線形性は認められなかった.

皮下投与したときの SR-0379 の生物学的利用率は 1, 10 及び 100 mg/kg でそれぞれ NC, 2.9 及び 1.2% であった.

静脈内投与での CL_{total} は 22300 mL/hr/kg, Vd は 3090 mL/kg であった.

17. 予見したことができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

- 1) 該当事項は無かった.

18. 参考文献

- 1) SR-0379 のラットを用いた 4 週間反復皮下投与毒性試験および 4 週間回復試験 (実施中試験) (実施施設: 株式会社シミックバイオリサーチセンター, 試験番号: 13K4632G)

Table 1 Clinical signs

Test substance	Dose (mL/kg)	Admin. route	Animal No.	Time after administration						
				pre	2min	5min	15min	30min	1h	2h
SR-0379	0.5	i.v.	01M03	-	-	H1	H1	-	-	-
			01M04	-	-	H1	-	-	-	
			01M05	-	-	H1	H1	H1	H1	-
			01M06	-	-	H1	H1	H1	-	-
	1	s.c.	02M01	-	-	-	-	-	-	-
			02M02	-	-	-	-	-	-	-
			02M03	-	-	-	-	-	-	-
			02M04	-	-	-	-	-	-	-
	10	s.c.	03M01	-	-	-	-	-	-	-
			03M02	-	-	-	-	-	-	-
			03M03	-	-	-	-	-	-	-
			03M04	-	-	-	-	-	-	-
	100	s.c.	04M01	-	-	-	-	-	-	-
			04M02	-	-	-	-	-	-	-
			04M03	-	-	-	-	-	-	-
			04M04	-	-	-	-	-	-	-

pre: before administration.

-: Normal, H1: Hypolocomotion

Table 2 Body weights

Test substance	Dose (mg/kg)	Admin. route	Animal No.	Administration day
SR-0379	0.5	i.v.	01M03	304
			01M04	317
			01M05	337
			01M06	286
			Mean	311.0
			SD	21.5
	1	s.c.	02M01	304
			02M02	302
			02M03	296
			02M04	310
Mean			303.0	
		SD	5.8	
10	s.c.	03M01	306	
		03M02	313	
		03M03	299	
		03M04	308	
		Mean	306.5	
		SD	5.8	
100	s.c.	04M01	289	
		04M02	314	
		04M03	296	
		04M04	302	
		Mean	300.3	
		SD	10.6	

Unit: g.

Appendix 1-1

Clinical signs during quarantine and acclimation periods

Study-No.: 13K6752R

SR-0379

Pharmacokinetics study

Animal : Rat

Strain: Crl:CD(SD)

Male

Animal-No.	Finding Part	Days												
		-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
M001			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M002			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M003			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M004			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M005			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M006			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M007			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M008			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M009			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M010			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M011			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M012			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M013			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M014			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M015			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M016			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M017			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M018			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-:No abnormalities

Appendix 1-2

Body weights during quarantine and acclimation periods

Study-No.: 13K6752R

SR-0379

Pharmacokinetics study

Animal : Rat

Strain: Crl:CD(SD)

Male

Animal-No.	Receipt day	Final day of quarantine	Grouping day	Unit:g
M001	194	233	298	
M002	198	238	314	
M003	198	231	297	
M004	198	240	309	
M005	188	224	278	
M006	202	238	302	
M007	199	240	295	
M008	211	246	317	
M009	188	237	296	
M010	194	230	287	
M011	193	234	297	
M012	193	240	287	
M013	192	229	291	
M014	193	228	277	
M015	193	230	297	
M016	200	241	301	
M017	203	232	296	
M018	206	232	298	
N	18	18	18	
Mean	197	235	297	
S.D.	6	6	11	

最終報告書

SR-0379 のガニクイザルにおける 1 週間反復皮下投与毒性試験

試験期間: 2014 年 1 月 17 日～2014 年 3 月 28 日

試験委託者: 国立大学法人大阪大学医学部
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2

試験施設: 株式会社イナリサーチ
〒399-4501 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188

試験責任者: 2014 年 3 月 28 日
株式会社イナリサーチ
試験研究センター 試験管理部

高島 宏昌

高島 宏昌

目次

	ページ
1. 要約	4
2. 試験目的	4
3. 試験施設	5
4. 血中濃度測定施設	5
5. 試験分担責任者	5
6. 試験期間	5
7. 遵守基準及び参照ガイドライン	5
8. 動物愛護	5
9. 材料及び方法	6
9.1 被験物質	6
9.2 対照物質及び媒体	6
9.3 投与液の調製	6
9.4 試験系	7
9.5 飼育条件	8
9.6 飼育材料と分析	8
9.6.1 飼料	8
9.6.2 飲料水	8
9.7 個体識別	9
9.8 群分け	9
9.9 投与量	10
9.10 投与量設定理由	10
9.11 投与	10
9.11.1 投与経路	10
9.11.2 投与方法	10
9.11.3 投与回数	10
9.11.4 投与期間	10
9.12 観察及び検査	10
9.12.1 一般状態	11
9.12.2 体重	11
9.12.3 摂餌量	11
9.12.4 血液学的検査	11
9.12.5 血液生化学的検査	12
9.12.6 剖検	13
9.12.7 器官重量	13
9.12.8 病理組織学的検査	13
9.12.9 TK測定	15
9.12.10 TKブランク血漿の採取	16
9.13 統計解析	17
10. 試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態	17
11. 試験関係資料の保存	17
12. 成績及び考察	17
12.1 死亡	17
12.2 一般状態	17
12.3 体重	18
12.4 摂餌量	18
12.5 血液学的検査	18

12.6	血液生化学的検査	18
12.7	剖検	18
12.8	器官重量	19
12.9	病理組織学的検査	19
12.10	TK測定	20
13.	結論	20
14.	文献	20

Annexes

Figures 1～2

Tables 1～18

Attachment 1

信頼性保証陳述書

1. 要約

SR-0379 を 1, 3 及び 10 mg/kg/day の用量で 1 群雌雄各 1 例のカニクイザルに 1 週間連日皮下投与し, その反復投与毒性を調べた. 対照群 (雌雄各 1 例) には生理食塩液を同様の方法で投与した. また, 被験物質の血漿中濃度を測定し全身的曝露について評価するため, TK 測定用の採血を実施し, TK ブランク用の採血を実施した. なお, TK ブランク血漿用動物 (雌雄各 6 例) には投与しなかった.

その結果, 雌雄とも死亡は認められず, 体重, 摂餌量, 血液学的検査及び器官重量の結果に異常はみられなかった. また, 一般状態及び血液生化学的検査には, 被験物質による毒性変化は認められなかった. 一方, 剖検及び病理組織学的検査結果には, 被験物質の薬理作用によると考えられる変化のほか, 投与部位局所に対する変化が認められたが, 全身性の影響はみられなかった.

病理組織学検査において雌雄とも 1 mg/kg/day 以上の群では投与部位に出血が認められ, 雄の 3 mg/kg/day 以上の群, 雌の 10 mg/kg/day 群での変化は低い用量群よりも程度が強かった. 剖検では投与部皮下の暗赤色巣が雄の対照群及び雌雄の被験物質投与群で認められたが, その範囲は雌雄の 1 mg/kg/day 群では狭小であり, 3 mg/kg/day 以上の群では 1 mg/kg/day 群よりも広がった. これらの変化には臨床使用においては起こらない注射針の穿刺といった, 反復的な投与部位への物理的的刺激が加味されている可能性が考えられるものの, 被験物質による投与部位局所に対する作用である可能性が考えられた.

一般状態においては雌雄とも 3 mg/kg/day 以上の群で投与部位の肥厚がみられ, 剖検所見では雌雄とも 3 mg/kg/day 以上の群で投与部皮下と筋肉の癒着が認められた. 病理組織学的検査の結果, 雌雄とも 1 mg/kg/day 以上の群で炎症細胞の浸潤, 筋線維の変性・壊死及び血管炎がみられ, 雄の 1 mg/kg/day 以上の群, 雌の 3 mg/kg/day 以上の群ではさらに浮腫が, 投与量の増加につれ, フィブリンの沈着や結合組織の増殖も認められた. 本試験の被験物質である SR-0379 は, その主たる薬理作用が血管新生作用及び線維芽細胞増殖・遊走作用であることから, これらの変化はいずれも, 本薬の薬理作用に起因するものであると推察された. このほか, 血液生化学的検査の結果, 雌雄とも 10 mg/kg/day 群で CK 活性に高値傾向がみられたが, カニクイザルの背景値の範囲内の変化であることから, 毒性変化ではないと判断した.

以上の結果, 雌雄とも一般状態, 体重, 摂餌量, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 剖検, 器官重量及び病理組織学的検査結果に, 被験物質投与によると考えられる薬理作用以外の全身性の反応は認められなかったことから, SR-0379 の 1 週間反復皮下投与時の全身に対する最大無毒性量 (NOAEL) は, 雌雄とも 10 mg/kg/day と考えられた.

投与部位では, 雌雄とも 1 mg/kg/day 以上の投与群で剖検において暗赤色巣がみられ, 病理組織学的検査において出血がみられたことから, SR-0379 の 1 週間反復皮下投与時の投与部位局所における最大無毒性量 (NOAEL) は 1 mg/kg/day を下回る量であると考えられた. 剖検において認められた暗赤色巣の範囲は雌雄とも 1 mg/kg/day 群では 3 mg/kg/day 以上の群よりも小さく, 病理組織学検査において認められた出血の程度も雌雄とも 1 mg/kg/day 群では軽度であったことから, 1 mg/kg/day 群における影響は明らかに 3 mg/kg/day 以上の群よりも軽度であった.

TK 測定の結果, 投与量は低用量と高用量では 10 倍の比率であるのに対し, C_{max} は雌雄とも低用量に比較して高用量では約 20 倍の高値を示した.

2. 試験目的

SR-0379 をカニクイザルに 1 週間連日皮下投与して, その反復投与毒性を調べた. また, 被験物質の全身的曝露について評価することを目的に TK 測定用の採血を実施した. また, TK ブランク用の採血を実施した.

3. 試験施設

名称: 株式会社イナリサーチ^{a)}
所在地: 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188 (〒399-4501)
^{a)} 病理組織学的検査 (鏡検) は病理東京分室で実施した。
所在地: 東京都千代田区外神田五丁目 2 番 2 号 (〒101-0021)

4. 血中濃度測定施設

名称: 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所
所在地: 茨城県那珂郡東海村村松 2117 (〒319-1182)
実施内容: TK 測定, TK 測定に関する記録の保存
TK 測定試験 試験責任者: 佐野 友一

5. 試験分担責任者

飼育, 投薬及び臨床観察: 西村 正吾
被験物質調製: 伯耆原 淳
血液検査: 平澤 由貴
剖検及び器官重量測定: 武井 由弘
病理組織標本作製: 佐倉 京子
病理組織学的検査: 小泉 治子
TK 測定用試料の採取: 小池 和恵

6. 試験期間

試験開始日: 2014 年 1 月 17 日
本試験への動物入手日 (移管日):
2014 年 1 月 17 日 (主試験用動物)
2014 年 1 月 21 日 (TK ブランク血漿用動物)
投与期間: 2014 年 1 月 28 日 (開始日) ~ 2 月 3 日 (終了日)
剖検日: 2014 年 2 月 4 日
試験終了日: 2014 年 3 月 28 日

7. 遵守基準及び参照ガイドライン

GLP: 「申請資料の信頼性の基準」 (薬事法施行規則第 43 条)
毒性試験ガイドライン: なし
TK ガイダンス: なし

8. 動物愛護

本試験は, 「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し, 試験施設の動物実験審査委員会 (IACUC) による審査を受けた試験計画書に従って

適正に実施された。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている（認証番号: 001107）。

9. 材料及び方法

9.1 被験物質

名称: SR-0379
 提供元: 試験委託者
 ロット番号: Y01011C1
 特性:
 純度: 98.47% (Certificate of analysis, 2013 年 3 月 1 日)
 ペプチド含量: 82.5% (合成時の Certificate of analysis, GLP 非適用, 2010 年 3 月 25 日)
 性状: White lyophilized powder
 安定性: 本ロットの被験物質の 2013 年 12 月 19 日までの保存安定性が保証されている。
 保存条件: 遮光, 気密, 冷凍 (許容範囲: -50.0°C ~ -20.0°C)
 保存場所: 被験物質保管室のメディカルフリーザー
 残余分の処置: 試験委託者に返却した。

9.2 対照物質及び媒体

名称: 日本薬局方生理食塩液
 製造元: 株式会社大塚製薬工場
 ロット番号: 3F74N, K3G93
 保存条件: 気密, 室温 (許容範囲: 1.0 ~ 30.0°C)
 なお, 対照群投与液については「9.3 投与液の調製」の項と同じ条件及び場所で保存した。
 保存場所: 被験物質保管室

9.3 投与液の調製

調製方法:

- 1) 被験物質をフリーザーから搬出し, 相対湿度 30%以下の条件 (デシケータ内) で 2 時間以上調湿した。
- 2) 電子天秤にて被験物質の 1.0301 g (ペプチド含量 82.5%により補正されている) を秤量し, ポリプロピレン製メスシリンダーに入れた。
- 3) 媒体を被験物質に加えて 170 mL とし, 27 回転倒混和して完全に溶解させた (5 mg/mL 液)。
- 4) 5 mg/mL 液の 48 mL を分取し, ポリプロピレン製メスシリンダーにて媒体で 160 mL とした (1.5 mg/mL 液)。

- 5) 1.5 mg/mL 液の 40 mL を分取し, ポリプロピレン製メスシリンダーにて媒体で 120 mL とした (0.5 mg/mL 液) .
- 6) 各投与液をあらかじめ, 試験番号, 被験物質名, 濃度, 調製日, 使用期限を記載したラベルを貼付したポリプロピレン製のボトルに移した.
- 7) 対照群用には媒体 20 mL × 7 本を用意した.

保存条件:

遮光, 気密, 冷蔵 (許容範囲: 1.0~8.0°C)

なお, 調製日を含めて 14 日間^{a)}の使用期限に対し, 調製日を含め 8 日以内に使用した.

a) 株式会社JCLバイオアッセイで実施された「SR-0379 の 0.9%生理食塩水中の分析法バリデーション及び安定性試験 (試験番号: JCL12095351)」¹⁾において, 0.01 及び 10 mg/mL の投与用試料が冷蔵 (許容範囲: 1~10°C) 遮光保存下で調製後 14 日間及びこれに続く室温 24 時間, 均一かつ安定であることが確認されている.

保存場所:

被験物質調製室の保冷库

投与後残液の処置:

焼却専用の産業廃棄物容器に廃棄した.

9.4 試験系

種:

カニクイザル

生産所:

Del Mundo Trading (Philippines)

供給源:

Primate Quality Control Center (PQCC) , Ina Research Philippines, Inc.

試験系選択の理由:

非げっ歯類の反復投与毒性試験で使用される種である. また, 背景データも豊富であることから選択した.

性別及び入手例数:

主試験用: 雄: 5 例 雌: 5 例

TK ブランク血漿用: 雄: 6 例 雌: 6 例

入手時年齢:

主試験用: 雄: 3 歳 雌: 3 歳

TK ブランク血漿用: 雄: 3 歳 雌: 3~4 歳

検疫及び馴化:

30 日間以上の法定検疫済の動物を主試験用 (試験施設への搬入日 2013 年 4 月 12 日, 8 月 1 日, 8 月 12 日) 及びTKブランク血漿用 (試験施設への搬入日 2013 年 3 月 1 日, 4 月 12 日, 8 月 8 日, 8 月 12 日) とした. 主試験用動物の馴化期間は本試験への動物入手日から投与開始前日までとし, 馴化期間中の試験操作は後述の「9.12 観察及び検査」の項の規定に従った.

投与開始時年齢:

雄: 3 歳 雌: 3 歳

使用時体重 (投与開始時): 雄: 2.71~3.40 kg

雌: 2.67~3.26 kg

9.5 飼育条件

飼育室:

主試験用:	202号飼育室
TK ブランク血漿用:	207号飼育室
温度:	許容範囲: 22.0~28.0°C (実測値: 202号飼育室 23.1~24.1°C)
湿度:	許容範囲: 40.0~80.0% (実測値: 202号飼育室 48.1~75.6%)
換気回数:	許容範囲: 15~17回/時間
照明時間:	12時間/日 (7時から19時までの人工照明)
給餌方法:	
給餌量:	100g/例/日 (ステンレス製給餌器使用)
給餌時間:	主試験用動物には9:00~13:00の間(入手日は15:38)に給餌した。 ただし、投与期間中は投与後、血液検査採血日は採血後、TK採血日は投与後6時間以降に給餌した。 剖検当日は給餌しなかった。
残餌:	主試験用動物については翌日給餌の際に、残餌の有無を確認したところ残餌はなかった。 また、血液検査採血の前日は、夕刻(16:00)に残餌の有無を確認したところ残餌はなかった。
給水方法:	自動給水装置から自由に摂取させた。
ケージへの収容:	ステンレス・高圧メラミン化粧板製ケージ(48W×85D×80H cm, エンリッチメント用のステンレス製遊具付き)に個別に収容した。
ケージの交換:	ケージ交換は行わず、毎日水洗した。

9.6 飼育材料と分析

9.6.1 飼料

名称:	PS-A (固型) ただし、TK ブランク採血用動物には、飼料の他に、毎日バナナ 1/4本程度を与えた。
供給源:	オリエンタル酵母工業株式会社 (千葉)
ロット番号:	131001, 131112
分析:	
栄養組成及び微生物:	供給源でのロットごとの分析
重金属などの混入物:	第三者機関によるロットごとの分析 (分析機関: Eurofins Scientific社, ドイツ)
分析結果:	試験評価に影響を及ぼす可能性のある混入物はなかった。

9.6.2 飲料水

種類:	市営上水道水
-----	--------